

EXPERIENCIA MEXICANA DE VALORIZACION BIOTECNOLOGICA DE SUBPRODUCTOS DE LA AGROINDUSTRIA DEL CAFE

Saucedo-Castañeda G., Romano-Machado J.M. ¹, Gutiérrez-Sánchez G., Delgado-Vidal F., Ramírez-Romero G. y Perraud-Gaime I. ²

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ave. Michoacán y la Purísima, Iztapalapa, C.P. 09340, A.P. 55 535, México D.F. Email:saucedo@xanum.uam.mx

¹ ICIDCA, Via Blanca 804, A.P. 4026, Ciudad Habana, Cuba

²IRD-México, Cicerón 609, Los Morales, C.P. 11530, México, D.F.

RESUMEN

La utilización de los subproductos de café representa un reto importante para la integración del proceso húmedo del café en México, si son manejados adecuadamente puede representar beneficios económicos importantes.

En los meses de recolección de la cereza del café, la atención está orientada hacia el beneficio del café y el manejo de subproductos puede ser problemático. En el ciclo de 1997-98 se produjeron en México cerca de 4.8 millones de sacos de 60 kg de café verde. La pulpa y el mucilago pueden llegar a representar hasta el 50% del café cereza, de donde se puede concluir que el volumen de subproductos es enorme. Con el objetivo de estabilizar la pulpa y conservar su valor nutricional, proponemos la realización de ensilaje bajo condiciones controladas. En esta etapa se pueden emplear inóculos de bacterias lácticas especializadas para la pulpa de café, que permita una rápida formación de ácido láctico y evite la proliferación de microorganismos indeseables que den lugar a la formación de etanol y ácido acético. El destino de la pulpa ensilada adecuadamente podrá tener diversas aplicaciones. En este sentido existen alternativas que ya han sido ensayadas con éxito como el composteo, lombricultura y producción de setas comestibles, cuyos productos finales se destinan a la agricultura y al consumo humano.

*La pulpa ensilada es un material rico en nutrientes que puede ser utilizado para la alimentación animal, sin embargo, su empleo presenta limitaciones debido a su alto contenido de cafeína y polifenoles, principalmente. En este respecto, proponemos realizar proceso de fermentación en medio sólido de la pulpa ensilada para disminuir considerablemente el contenido de cafeína y polifenoles de la pulpa. Esta etapa se realiza con el empleo de hongos filamentosos (*Penicillium* y *Aspergillus*) capaces de utilizar la cafeína como fuente de nitrógeno y los polifenoles como fuente de carbono, bajo condiciones controladas de fermentación. El producto final de esta fermentación se puede destinar a animales monogástricos, poligástricos y a la acuicultura.*

La combinación óptima de utilización de los subproductos del café deberá realizarse mediante estudios de investigación de operaciones que consideren el desarrollo económico y tecnológico de los procesos.

INTRODUCCIÓN

A producción de café en el mundo es una actividad comercial importante que da como consecuencia una derrama económica localizada principalmente en países de América Latina, que en orden de producción son Brasil, Colombia y México. El proceso que se utiliza en México y Colombia es el llamado beneficio húmedo, que utiliza cantidades variables de agua, mientras que en Brasil el proceso que se emplea de manera mas extendida es el proceso seco. En el caso particular de México, la producción de café verde en 1998-1999 se estima cercana a 5 millones de sacos (60 kg) de café verde. El grano de café representa cerca del 50 % del café cereza en base seca. La proporción de pulpa en el café cereza puede cambiar de acuerdo al estado de madurez de la

cereza, condiciones climáticas y la variedad de café cultivada. Sin embargo se puede aceptar que la pulpa y el mucilago representan cerca del 30 y 10 % del café cereza, respectivamente. Esto implica una cantidad muy importante de residuos a tratar es decir del orden de 1-0.8 millones de Toneladas, concentrados en dos estados, Veracruz (23%) y Chiapas (34%), y en un temporada de alrededor de 6 meses.

Por otra parte, la normatividad en respecto a las descargas en los beneficios están cambiando rápidamente, en el caso de México el 1 de Enero de 2000 entrará en vigor una norma que indica que la descarga de los beneficios deberá tener un nivel de DBO menor a 1500 ppm. Esto ha llevado a los beneficiadores a esforzarse por reducir notablemente el consumo de agua en casi un 90%. Con el uso de las despulpadoras actuales

se llega a consumir 300-800 L por ton de café cereza. Sin embargo, persiste el gasto de agua en el proceso de fermentación y lavado. Por otra parte, existe un esfuerzo importante de parte de las empresas constructoras de equipo de proporcionar desmucilagadoras que operan con un consumo muy bajo de agua, generando un residuo concentrado que es el mucilago, en forma de un especie de miel densa y muy concentrada en sólidos solubles y suspendidos.

Así mismo la fluctuación de los precios del café cereza ha sido importante en los últimos diez años, con precios tan extremos que varían desde 52 a 254 US dólares por saco de 100 libras. Actualmente la cotización del saco de café verde en la bolsa de Nueva York oscila alrededor de 100 US dólares por saco. Esto puede sugerir la conveniencia de considerar los residuos de la cereza del café como una alternativa para equilibrar la economía fluctuante de la industria cafetalera (Claridades Agropecuarias, 1999).

Las alternativas que se han explorado para aprovechar los residuos son muy variadas e incluyen la lombricultura, producción de setas comestibles, alimentación de ganado, secado, etc. algunas de las cuales ya han sido presentadas ampliamente en este evento por otros conferencistas.

Estas alternativas van de complejas a muy sencillas, sin embargo algunas de estas alternativas no han sido evaluadas aun económicamente. La solución tecnológica no es única, depende del desarrollo tecnológico del beneficio, de la inversión a realizar y de su recuperación.

Una de las alternativas estudiadas es la utilización de la pulpa de café como alimento animal, que se ve limitada a causa de su elevado contenido de humedad, haciendo difícil su manejo, transporte y almacenamiento; esta humedad, junto con su contenido rico en nutrientes (azúcares, proteínas, aminoácidos) favorecen el desarrollo de su microflora endógena, que en condiciones incontroladas puede afectar la calidad del producto, además de que es difícil su conservación. Además, en la pulpa de café están presentes sustancias con efectos antifisiológicos como la cafeína, y antinutricionales como los compuestos fenólicos que constituyen el principal factor limitante para su utilización en alimentación animal. La información disponible sobre los compuestos fenólicos de la pulpa de café es escasa, más cualitativa que cuantitativa, y obtenida generalmente a partir del material fresco. En cerdos y ganado de carne, alimentados

con pulpa de café, se ha observado un aumento en la excreción de orina; niveles mayores de 30% de la pulpa en la ración pueden causar mortalidad en ratas y pollos jóvenes. En el ganado se ha observado digestibilidad baja de la proteína, lesiones en la piel, pérdida de pelo y en algunos casos la muerte cuando hay consumos altos de pulpa.

Por otra parte, la Fermentación en Medio Sólido se define como el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos en ausencia de agua libre. Sin embargo, el sustrato puede contener suficiente humedad para favorecer el crecimiento microbiano y que existe en forma absorbida dentro de la matriz sólida (Pandey, 1992). El origen de las fermentaciones en medio sólido no es reciente, el hombre las ha utilizado desde hace mucho tiempo, ya sea para la preparación de alimentos fermentados o quesos, así como para el ensilaje (Moo-Young y col., 1983; Hesseltine, 1987).

La FMS se propone como una alternativa en las tecnologías actualmente empleadas para la utilización y la valorización de productos agrícolas primarios. El objetivo de numerosas fermentaciones sólidas alimentarias tradicionales no es aumentar la cantidad de proteínas *de novo* en los alimentos, pero sí mejorar las posibilidades de conservación, de transformar propiedades físicas u organolépticas. Por otra parte, estas fermentaciones permiten eliminar los factores antinutricionales o antifisiológicos de ciertos productos vegetales. En el caso de la pulpa de café, su valor nutritivo puede mejorarse a través de una fermentación sólida con hongos filamentosos empleando la cafeína como fuente de nitrógeno para su crecimiento, y posiblemente los taninos como fuente de carbono (Roussos y col., 1989).

El objetivo de este trabajo es presentar los avances más recientes en relación a la degradación de la cafeína en la pulpa de café a través de un proceso de fermentación en medio sólido.

MATERIALES Y METODOS

Sustratos: Las muestras de pulpa fresca (PF) se obtuvieron un beneficio de café en la zona de Jalapa, Veracruz, México durante la cosecha de 1997-1998. Una parte de las muestras se congeló a -20°C hasta su utilización. Un total de 220 kg de pulpa fueron ensilados con una cepa de bacteria homoláctica a una concentración de 2.63

- 5.26×10^7 cel/g MH, obteniendo así la pulpa ensilada (PE).

Pasteurización: Las muestras de PF y PE, fueron pasteurizadas en corriente de vapor a presión atmosférica (95 °C) durante 1 h. Se analizaron cuentas de UFC y humedad. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 h.

Desarrollo de los inóculos: Se utilizó una cepa de *Penicillium commune* (V33A25), aislada de la PC perteneciente a la colección IRD (exORSTOM) y UAM y que ha mostrado capacidad de degradación de cafeína (Aquiuhualt y col., 1988; Gaime-Perraud, 1995; Hakil y col., 1997; Roussos y col., 1995). La cepa se subcultivo a 30 °C durante 7 días. Los niveles de inóculo probados fue de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 esporas g^{-1} de sólido húmedo.

Condiciones de fermentación: Las experiencias de FMS se realizaron en el sistema descrito por Raimbault y Alazard en 1980, a una densidad aparente de $0.6 g cm^{-3}$, 30 °C y con un flujo de aire húmedo de $0.5 vkgm (dm^3 de aire * kg^{-1} de medio * min^{-1})$.

Determinaciones analíticas: Las muestras sólidas fueron molidas con picador Braun por 20 seg y extraídas con agua en agitación, 20 min, 1:10 (p/p). El pH se midió en la suspensión resultante con un potenciómetro. Las suspensiones fueron decantadas en centrífuga Hettich a $5000x g$ por 20 min y los sobrenadantes se conservaron a -20 °C hasta su análisis. El contenido de humedad de las muestras sólidas se determinó por gravimetría.

La concentración de ácidos grasos volátiles (AGV'S), glucosa y fructosa se realizó por HPLC en un cromatógrafo Perkin Elmer con las condiciones siguientes: columna Rezek Organic Acid, fase móvil H_2SO_4 30 mM, flujo $0.6 cm^3 min^{-1}$, temperatura 50 °C, detector de índice de refracción.

La cafeína se extrajo de las muestras sólidas secas y trituradas y tamizadas (malla 35) con una mezcla de cloroformo/ isopropanol (50:50 v/v). La cafeína en los extractos se determinó por , respectivamente. Con la disminución de humedad se evitan los riesgos de escurrimientos en la FMS.

HPLC, empleando una modificación a la técnica reportada por Denis en 1996.

Determinación de CO_2 por cromatografía de gases: Se empleó un cromatógrafo de gases Gow-Mac 580, equipado con una columna concéntrica Alltech (CTR1) y un detector de conductividad térmica de acuerdo a lo reportado por Saucedo-Castañeda y col., 1994.

Conteo de microorganismos: Se utilizó medio Agar para Métodos Estándar (Bioxón) para los conteos de microorganismos totales y PDA (Bioxón) con antibiótico para conteo de hongos y levaduras. Los conteos se realizaron a las 24 h de incubación a una temperatura de 30 °C. Los resultados se expresaron como UFC g^{-1} de materia seca (Perraud-Gaime, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSION

Pasteurización de la PF y PE

Como se aprecia en la Figura 1 la carga inicial de microorganismos totales y de hongos y levaduras es 2 veces superior en la PF que en la PE. Durante la pasterización de la PE y la PF se obtuvo una reducción completa de los microorganismos presentes a los 20 min de exposición a corriente de vapor directo para ambos sustratos. Esto permitió reducir la carga contaminante de la PC en un corto tiempo y estandarizar las condiciones iniciales para la FMS por esto se decidió hacer la pasteurización por 20 min a los sustratos utilizados en las experiencias posteriores.

Por otra parte la pasteurización no provocó un aumento apreciable en el contenido de agua de los sustratos tratados (Figura 2) sino que se mantuvo constante durante entre 78 y 83 % de humedad durante todo el proceso de pasteurización. No obstante los sustratos se mantienen con un alto contenido de agua al final del tratamiento térmico lo que puede provocar pérdidas de agua y nutrientes por escurrimiento durante la FMS. Para evitar este contratiempo se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 h y se logró reducir los niveles de humedad hasta 74.15 y 75.43 % en PE y PF

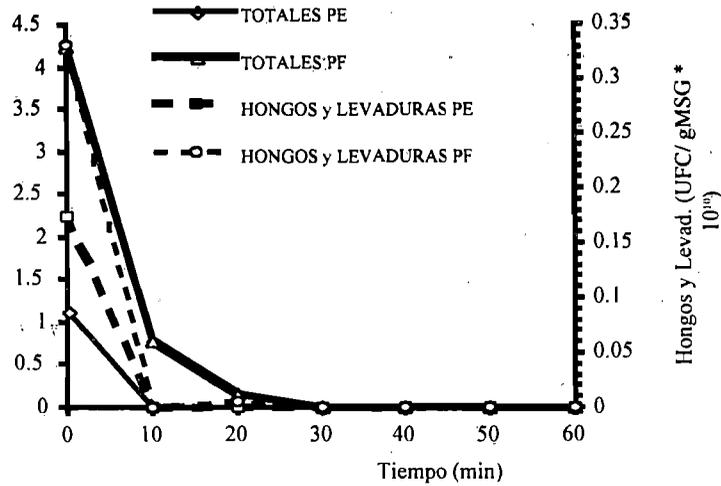


Figura 1. Reducción de la microflora presente en la pulpa de café ensilada (PE) y fresca (PF) con el tiempo de pasteurización con vapor directo a 95 °C.

Efecto de la pasteurización en la degradación de cafeína en PE

Para estudiar el efecto que tuvo la pasteurización en la degradación de la cafeína en PE por la cepa de *P. commune* empleada se realizaron experiencias con PE pasteurizada y sin pasteurizar. Se probó el efecto de diferentes niveles de inóculo en la FMS en ambos materiales.

En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos en 4 días de FMS. Se observó un cambio significativo de 30 % ($\alpha=0.05$) en la reducción de la cafeína presente cuando se

pasteurizó la PE por 20 min en corriente de vapor, se secó a temperatura ambiente 24 h y se inoculó con *P. commune*. Estos resultados mostraron que para lograr niveles apreciables de reducción de cafeína (94 %) en cortos tiempos (4 días) fue necesario reducir la carga inicial de contaminantes para favorecer el crecimiento de la cepa de hongo empleada. Cuando no se pasteurizó se redujo la degradación hasta 60 - 70 %, comparable a la obtenida en las experiencias descritas en párrafos precedentes para el mismo tiempo de fermentación.

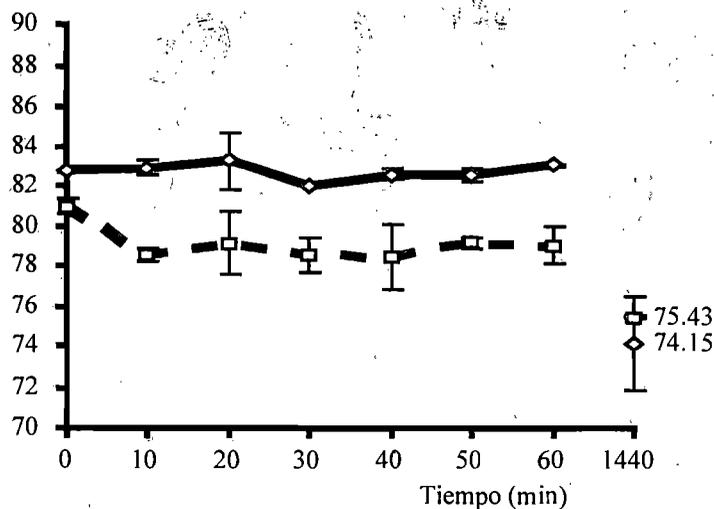


Figura 2. Comportamiento del contenido de humedad en pulpa de café ensilada (-◇-) y fresca (-o-) durante la pasteurización con corriente de vapor a 95 °C y secado posterior a temperatura ambiente por 24 h.

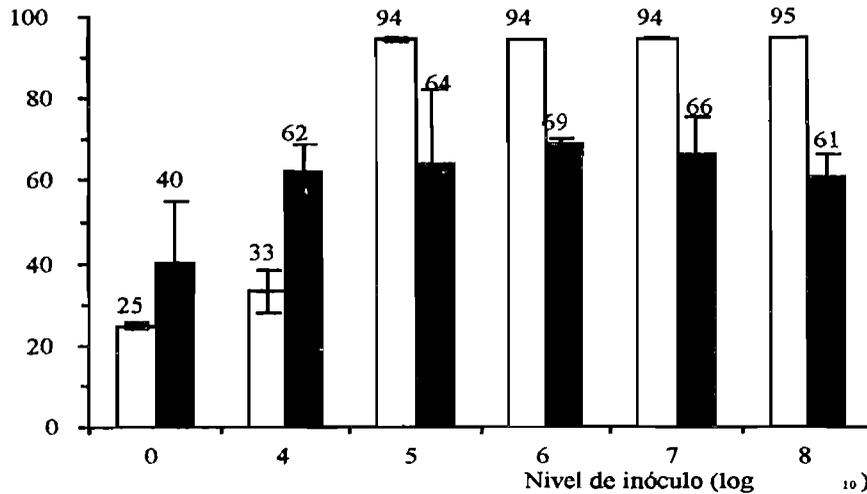


Figura 3. Eficiencia de degradación de cafeína por *P. commune* en 4 días de fermentación en medio sólido de pulpa de café ensilada pasteurizada (barras vacías) y sin pasteurizar (barras rellenas). La inoculación de la PE aumentó la velocidad de producción de dióxido de carbono como se observa en la

El aumento de la concentración de inóculo tuvo un efecto positivo en la degradación de la cafeína a partir de una concentración de 10^5 esporas g^{-1} de sustrato húmedo. Un aumento del nivel de inóculo hasta 10^8 esporas g^{-1} no produjo un incremento apreciable en la degradación de cafeína. Cuando no se inoculó el sustrato la microflora natural degradó solo el 40 % de la cafeína presente en PE sin pasterizar. Lo anterior corroboró el planteamiento inicial propuesto

sobre la necesidad de inocular la PE, con la cepa de *P. commune* que tiene la capacidad para degradar cafeína, para lograr altas eficiencias en la reducción del contenido de cafeína.

Es necesario aclarar que aunque no se alcanzaron las eficiencias de reducción de la cafeína obtenidas en otros trabajos se continua estudiando en proceso de FMS sobre los sustratos naturales PF y PE para incrementar los niveles de reducción.

Figura 4. Al inicio de la fermentaciones se observó un tiempo de retardo en la germinación de 12 a 20 h provocado por la presencia de ácidos orgánicos del ensilaje. Las velocidades máximas se obtuvieron primero en PE pasteurizada, 36 h, (Figura 4a) que en PE sin pasteurizar (48 h) (Figura 4b). Los valores de velocidades máximas superiores encontrados en PE sin pasteurizar se debieron a la contribución de la microflora natural de la PE a la producción de CO_2 .

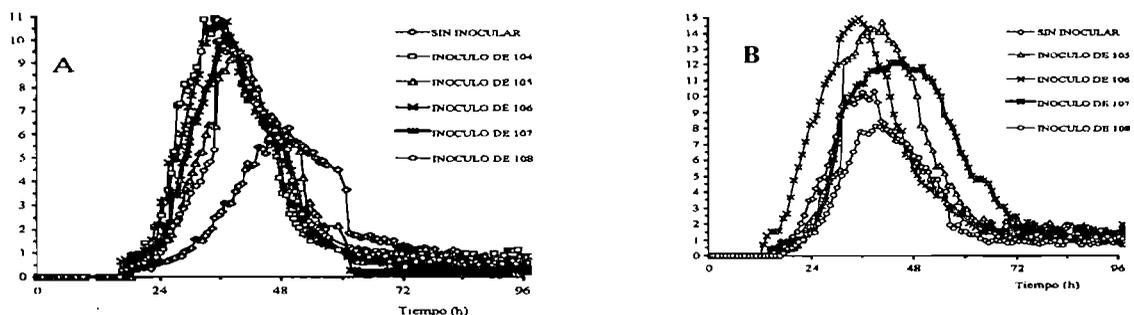


Figura 4. Comportamiento de la velocidad de producción de CO_2 en 4 días de fermentación en medio sólido de pulpa de café ensilada pasteurizada (a) y sin pasteurizar (b) con diferentes niveles de inóculo de *P. commune*.

CONCLUSIONES

El ensilado de la PC favoreció la degradación de la cafeína de la pulpa de café por la cepa de *P. commune* utilizada. La pasteurización mejoró la eficiencia degradativa del hongo por la eliminación de contaminantes. La inoculación de la PE con niveles de 10^6 esporas g^{-1} de sustrato húmedo aumentó significativamente la eficiencia de degradación de la cafeína presente.

Los resultados obtenidos mostraron la viabilidad de utilizar la FMS para reducir el contenido de cafeína de la PC sin alterar las características del sustrato y con la posibilidad de poder utilizar primero el ensilado como un método sencillo de conservación para después degradar la cafeína de la PE bajo condiciones controladas de FMS. Además se establecieron estas condiciones lo que permitirá enfrentar el escalamiento del proceso.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por la Comunidad Europea contrato IC 18 * CT 970185

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aquiahualt M.A., Roussos S. y Trejo M.R. (1988). Coffee pulp detoxification by solid state fermentation: Isolation identification and physiological studies. Proceedings of the seminar Solid State Fermentation in Bioconversion of Agroindustrial Raw Materials, M. Raimbault, ORSTOM (Eds.), Montpellier, France, 13-26.

Anónimo (1999). Coffee supply and demand balance. Edición especial de: *Claridades Agropecuarias*, México, H. Fanghanel y C. Montañez (Eds.), pp 21-36.

Denis S. (1996). Degradation de la cafeine par *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp.: Etude physiologique et biochimique. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 180 p.

Gaime-Perraud I. (1995). Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la decafeination de la pulpe de cafe. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 210 p.

Hakil M., Denis S., Viniegra-González G. y Augur C. (1998). Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. *Enzyme and Microb. Technol.*, 22: 355-359.

Hesseltine C W. (1987). Solid state fermentation - An overview. *Int. Biodeterioration*, 23: 79-89.

Moo-Young M. A., Moreira R. y Tengerdy R. P. (1983) Principles of solid substrate fermentation of the filamentous fungi. En: *Fungal Biotechnology*, S. E. Smith, D. R. Berry y B. Vristiensen (Eds.), Arnold, Londres. Vol.IV: 117-174.

Pandey A. (1992). Recent process development in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 27: 109-117.

Raimbault M. y Alazard D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Europ. Jour. of Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 9: 199-209.

Roussos S., Aquiahualt M. A., Cassaigne J., Favela e., Gutiérrez M., Hannibal L., Huerta S., Nava G., Raimbault M., Rodríguez W., Salas J. A., Sánchez R., Trejo-Hernández M. R. y Viniegra-González G. (199). Detoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida. Resúmenes I-SIBAC, Jalapa, México, 12-15 Abril. Parte II: 121-143.

Roussos S., Aquiahualt M. A., Trejo-Hernández M. R., Gaime-Perraud I., Favela E., Ramakrishna M., Raimbault M. y Viniegra-González G. (1995). Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 756-762.

13 Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández M. R., Lonsane B. K., Navarro J. M., Roussos S. y Raimbault M. (1994). On-line automated monitoring and control system for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, 29: 13-24.

Saucedo-Castaneda G., Romano-Machado J.M., Gutiérrez-Sanchez G., Delgado-Vidal F., Ramirez-Romero G., Gaime Perraud Isabelle. (2000).

Experiencia mexicana de valorización biotecnológica de subproductos de la agroindustria del café.

In : Riede C.R. (ed.), Sera T. (ed.), Soccol C.R. (ed.), Roussos Sevastianos (ed.). Anais do 3 Seminário internacional sobre biotecnologia na agroindustria cafeeira = Proceedings of the 3rd international seminar on biotechnology in the coffee agroindustry.

Londrina, PR (BRA) ; Montpellier : IAPAR ; IRD, p. 329-334.

SIBAC : International Seminar, 3., Londrina, PR (BRA), 1999/05/24-28.